

اثر تجویز نخاعی کربنوکسالون و موسیمول بر درد شیمیایی در موش‌های صحرایی متحمل فرآیند حذف فیبرهای C

مسعود فریدونی^{۱*}، سیمین افشار کارگر^۲

چکیده

زمینه و هدف: لامینای ۲ در شاخ پشتی نخاع، واجد ترمینال‌های سیناپسی فراوانی از فیبرهای C و مقدار کمی فیبرهای Aβ می‌باشد. اینترنورون‌های مهاری گابااژیک موجود در لامینای ۲، نقش مهمی در احساس درد ایفا می‌کنند. اتصال‌های منفذدار (Gap Junctions, Gj)، کانال‌های بین سلولی هستند که امکان نقل و انتقال سلولی را برای یونها و مولکول‌های کوچک فراهم می‌آورند. در این پژوهش با استفاده از آزمون فرمالین، اهمیت فیبرهای C در انتقال درد، ضمن تداخل در سیستم گابااژیک و Gj با به کارگیری کپسایسین، موسیمول و کربنوکسالون بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، از ۹ گروه موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) شامل گروه‌های تیمار شده با کپسایسین در نوزادی، کنترل و شم استفاده شد. حیوانات بالغ سالین، کربنوکسالون (۱ نانو مولار) و موسیمول (۰/۳ میکروگرم) را به تنهایی و با هم دریافت کردند. پس از تزریق کف پای ۰/۰۵ میلی‌لیتر فرمالین ۲/۵٪، رفتار درد به مدت یک ساعت بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و تی توکی مقایسه شدند. سطح معنی داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در گروه‌های تیمار شده نوزادی با کپسایسین که سالین و کربنوکسالون را دریافت کردند، کاهش درد یکسان بود، اما موسیمول کاهش درد را در فاز التهابی آزمون فرمالین بیشتر کرد ($p < 0/01$). همچنین تجویز توأم کربنوکسالون و موسیمول، کاهش درد بیشتری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به حذف فیبرهای C و تحریک گابا- A، حذف Gj نمی‌تواند اثر قابل ملاحظه‌ای بر تخفیف درد بیشتر از آنچه که حذف فیبرهای C و تحریک سیستم گابااژیک در سطح نخاع دارد، بروز دهد.

کلید واژه‌ها: درد؛ رشته‌های عصبی بدون میلین؛ کربنوکسالون؛ موسیمول.

^۱دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مسعود فریدونی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

fereidoni@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۸

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Fereidoni M, Afshar Kargar S. The Effect of intrathecal administration of carbenoxolone and muscimol on chemical pain in rats underwent C-fiber removal process. Qom Univ Med Sci J 2015;9(5):1-10. [Full Text in Persian]

مقدمه

درد یک تجربه حسی و هیجانی ناخوشایند است که با آسیب حقیقی یا بالقوه بافتی همراه است (۱). در حقیقت، درد پاسخ فیزیولوژیکی مهمی برای حفاظت از بدن بوده و به‌عنوان سیگنال هشداردهنده‌ای برای بدن، تغییرات رفتاری را نیز اعمال می‌کند که خود سبب تسهیل التیام و بهبودی آن می‌شود (۲،۳). شرایط پاتوفیزیولوژیکی بی‌شماری همچون دیابت، عفونت‌های ویروسی، آسیب‌های عصبی و التهاب می‌توانند منجر به بروز دردهای مزمن یا پایدار گردند (۲). درد به‌وسیله نورون‌های موجود در گانگلیون ریشه پشتی نخاع، حس شده و به سیستم عصبی مرکزی انتقال می‌یابد. این نورون‌ها به‌طور عملکردی به سه جزء گیرنده‌های درد (پایانه اعصاب محیطی) شامل محرک‌هایی که باعث ایجاد درد می‌شوند (همچون محرک‌های مکانیکی، گرما، حس درد)، آکسون‌هایی که علائم درد (درد آسیتی) را هدایت می‌کنند و پایانه پیش‌سیناپسی که علائم عصبی را به نورون بعدی و به سمت مغز انتقال می‌دهند، تقسیم می‌شوند (۴).

دو گروه اصلی از گیرنده‌های درد وجود دارد: ۱- گروه آوران‌های میلی‌متر شده $A\delta$ که دارای قطر متوسط بوده و درد سریع را میانجی‌گری می‌کنند؛ ۲- گروه فیبرهای C میلی‌متر نشده با قطر کم که به‌طور آهسته درد گند را هدایت می‌کنند (۵،۶).

سطح شاخ پشتی نخاع (لامینای ۱ و ۲)، پایانه‌هایی از تعداد زیادی فیبرهای آوران میلی‌متر و غیرمیلی‌متر دریافت می‌کند که حاوی داده‌های مربوط به Nociception، درد، دما و سایر احساسات می‌باشد (۷). اکثر نورون‌های این ناحیه اینترنورون‌های مدارهای محلی (بجز Projection نورون) هستند. این اینترنورون‌ها می‌توانند تحریکی یا مهارتی بوده و ورودی‌شان را از مراکز مغزی بالاتر و یا دیگر اینترنورون‌ها، علاوه بر فیبرهای محیطی دریافت کنند. بنابراین، اینترنورون‌ها نقش بحرانی در سطح تحریک‌پذیری و خروجی شاخ پشتی نخاع بازی می‌کنند (۸). گیرنده گابا A-، بیشتر اعمال مهارتی در سیستم اعصاب محیطی و مرکزی را میانجی‌گری می‌کند. این گیرنده‌ها در اینترنورون‌های سطح شاخ پشتی نخاع شناسایی شده‌اند (۹،۱۰). از آنجایی که شاخ پشتی نخاع، محل خاتمه فیبرهای آوران نوع C و $A\delta$ می‌باشد، بنابراین، گیرنده‌های گابا در پردازش اطلاعات Nociceptive، درگیر

هستند (۱۱). اتصالات منفذدار (Gap Junctions)، کانال‌های غشایی حساس به ولتاژی هستند که سیتوپلاسم سلول‌های مجاور را به هم متصل می‌کنند. این اتصالات بستری را برای مبادله یون‌ها، پیامبران ثانویه و متابولیت‌های کمتر از هزار کیلو دالتون فراهم کرده و اجازه ارتباط الکتریکی، بیوشیمیایی و متابولیکی را بین سلول‌ها می‌دهند (۱۲،۱۳). کربنو کسالون، به‌عنوان مسدودکننده اتصالات منفذدار منجر به ایجاد بی‌دردی طی آزمون‌های مختلف درد می‌شود که ممکن است از طریق به هم ریختن آرایش کانکسین‌ها، این اثرات را اعمال کند (۱۴). در سیستم عصبی پستانداران، حداقل ۶ نوع کانکسین در سلول‌های اصلی سیستم عصبی مرکزی شامل نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها بیان می‌شوند (۱۴،۱۵). در مطالعات قبلی نشان داده شد تجویز نوزادی کپسایسین بلافاصله پس از تولد در موش‌های صحرایی منجر به کاهش احساس درد شیمیایی پس از بلوغ می‌شود که به حذف فیبرهای C در اثر مسمومیت ناشی از تحریک زیاد نسبت داده شده است (۱۶). مطالعات دیگر نیز نشان داده است تجویز کربنو کسالون در موش‌های صحرایی بالغ می‌تواند منجر به کاهش احساس درد شیمیایی شده که این اثر به انسداد اتصالات منفذدار در بین نورون‌های موجود در شاخ پشتی نخاع نسبت داده می‌شود (۱۷). از طرفی، یافته‌های پیشین حاکی از آن است که تجویز نخاعی آگونیست‌های گابا همچون موسیمول منجر به کاهش علائم دردهای نوروپاتی می‌شود، اما این اثربخشی آگونیست‌های گابا در التیام درد با گذشت زمان کاهش می‌یابد (۱۷،۱۸). فرضیه این پژوهش بر وجود اتصالات منفذدار در مسیر عصبی مرتبط با فیبرهای C در انتقال درد، همچنین وجود این اتصالات در ارتباطات بین نورون‌های گابارژیک در سطح نخاع در ارتباط با تعدیل درد استوار شده است. برای بررسی این فرضیه با استفاده از تجویز نوزادی کپسایسین، فرآیند حذف فیبرهای C انجام گرفت و پس از بلوغ، آزمون درد در حضور و عدم حضور انسداددهنده عمومی اتصالات منفذدار (کربنو کسالون) و در ادامه، در حضور و عدم حضور آگونیست گابا (موسیمول) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر آلبینو، نژاد ویستار

آزمون شیمیایی قرینه (Chemosenstivity Corneal Test) قرار گرفتند. بدین ترتیب که یک قطره هیدروکسید آمونیوم ۱٪ درون چشم آنها ریخته شد و تعداد دفعاتی که آنها با مالش دست (به مدت ۱۰ ثانیه)، چشم‌ها را می‌مالیدند شمرده می‌شد. از آنجایی که پاسخ به تحریکات شیمیایی به‌طور عمده به‌وسیله فیبرهای C میانجیگری می‌شود کاهش تعداد دفعات مالش چشم در موش‌های گروه C-lesion در مقایسه با موش‌های گروه C-normal، نشانگر تأیید کاهش عمده فیبرهای C بود (۱۶). در مرحله بعد، تمامی حیوانات بالغ، مورد عمل جراحی کانول‌گذاری به‌منظور تجویز نخاعی قرار گرفتند. کانول‌گذاری به روش Yaksh و Rudy انجام گرفت (۲۱). در این مطالعه، ابتدا حیوانات با تجویز داخل صفاقی کتامین (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استرئوتاکس ثابت گردید و در فاصله بین گوش‌ها و به سمت پایین، برشی به اندازه ۲ سانتی‌متر ایجاد و عضلات به آرامی کنار زده شدند تا غشای اطلس-اکسی پیتال نمایان گردد. به کمک یک سوزن سر کج با ایجاد سوراخی در این غشا، مایع مغزی نخاعی از آن خارج گردید که نشانه دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه بود. سپس یک لوله پلی‌اتیلن ۱۰ (PE-10) به طول ۱۱ سانتی‌متر (که در فاصله ۸ سانتی‌متر از یک طرف آن، به‌وسیله پارافیلیم برجستگی کوچکی ایجاد شده بود)، به آرامی به فضای تحت عنکبوتیه فرو برده شد، به‌طوری‌که انتهای کانول، بین مهره‌های قطعات کمری ۴ و ۵ قرار گرفت و ۳ سانتی‌متر از کانول برای تجویز دارو، خارج از نخاع باقی ماند. پس از گذراندن یک دوره بهبودی ۷-۵ روزه، محلول‌های مورد نظر به حجم ۱۰ میکرولیتر و به فاصله زمانی ۵ دقیقه در گروه‌هایی که بیش از یک دارو را طی تجویز نخاعی دریافت کرده بودند، تجویز شد. سنجش درد شیمیایی به‌وسیله آزمون فرمالین انجام گرفت. در این آزمون ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول فرمالین ۲/۵٪ به‌صورت زیرجلدی به کف پای راست حیوان تزریق و رفتار حیوان به مدت یک ساعت پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفت. تزریق فرمالین به کف پا موجب ایجاد دو مرحله مشخص در رفتار درد می‌شود. درد در مرحله اول به مکانیسم‌های نوروزنیک وابسته بوده و پاسخ درد در این مرحله ناشی از تحریک شیمیایی مستقیم فرمالین بر

در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در ۹ گروه ۷ تایی استفاده شد. حیوانات در دمای حدود 22 ± 2 درجه سانتیگراد و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در قفس‌های مخصوصی از جنس پلکسی گلاس نگهداری شدند. موش‌ها در تمام مدت بجز زمان انجام آزمایشها به آب لوله‌کشی شهر و پلت‌های غذایی فشرده (محصول شرکت جوانه خراسان) دسترسی آزاد داشتند و یک‌هفته قبل از شروع آزمایشها، برای تطابق با محیط در فضای آزمایشگاه قرار گرفتند. تمامی مراحل تکثیر و پرورش در حیوانخانه و انجام آزمایشها در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد، تمامی عملیات آزمایشگاهی روی حیوانات با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق علمی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۹).

موش‌های صحرایی در دو گروه قرار گرفتند:

۱- گروه C-lesion که به‌منظور تخریب فیبرهای C، در آن نوزادان موش‌های صحرایی ۴۸-۲۴ ساعت پس از تولد، محلول کپسایسین (Sigma, Germany) ۵٪ را (به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) طی تجویز داخل صفاقی (i.p) دریافت کردند (۲۰) و پس از بلوغ، موش‌های این گروه به چهار دسته شامل گروه دریافت‌کننده تجویز نخاعی (i.t) سالین، کربنو کسالون (۱ نانو مولار - Sigma)، موسیمول (۰/۳ میکروگرم بر میکرولیتر - Sigma)، کربنو کسالون/ موسیمول تقسیم شدند؛

۲- گروه C-normal که در آن حیوانات کپسایسین نوزادی دریافت نکردند و موش‌های صحرایی این گروه نیز به چهار دسته با تیمارهای مشابه گروه C-lesion تقسیم شدند. یک گروه از موش‌های صحرایی نیز به‌عنوان گروه شم در نظر گرفته شد که حیوانات در آن، ۴۸-۲۴ ساعت پس از تولد، حلال کپسایسین (شامل سالین، توئین ۸۰ و اتانول به ترتیب به نسبت ۱:۱:۸) را به‌صورت تجویز داخل صفاقی (i.p) و پس از بلوغ، سالین را طی تجویز نخاعی دریافت کردند.

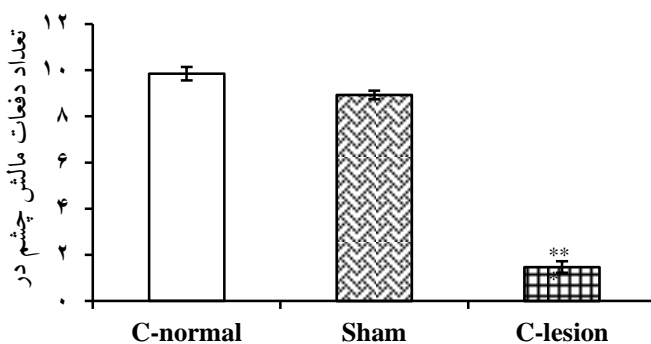
قبل از تیمار، گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی بالغ برای اطمینان از حذف اکثریت فیبرهای C در دوران نوزادی و پیشبرد سایر مراحل آزمایش (سه گروه از حیوانات C-lesion، C-normal و حلال)؛ پس از رسیدن به وزن مورد نظر، تحت

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 رسم شدند. تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism نسخه ۵، همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی توکی انجام گرفت. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد دفعات مالش چشم طی ۱۰ ثانیه پس از اضافه کردن هیدروکسید آمونیوم به چشم، در موش‌های صحرایی گروه C-lesion (دریافت‌کننده کپسایسین نوزادی) در مقایسه با گروه C-normal و شم (دریافت‌کننده حلال کپسایسین نوزادی)، کاهش معنی‌داری یافت ($p < 0.001$) (نمودار شماره ۱)، که این مسئله نشان‌دهنده تخریب قابل توجه فیبرهای C در حیوانات گروه C-lesion بود.

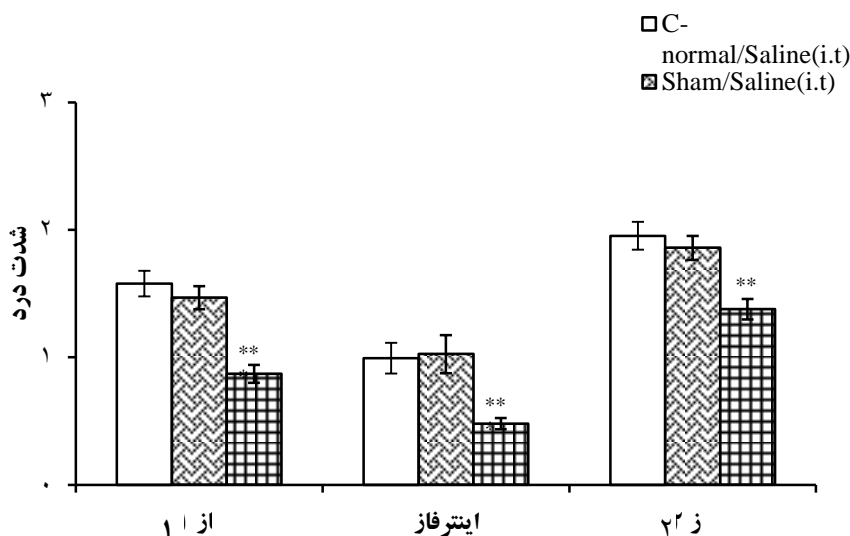
روی پایانه‌های عصبی - محیطی می‌باشد که در ۵ دقیقه اول پس از تزریق فرمالین رخ می‌دهد (فاز اول)، درحالی‌که مرحله دوم، نتیجه واکنش‌های التهابی در بافت‌های محیطی بوده و از دقیقه ۱۱ شروع و گاهی تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین نیز طول می‌کشد (فاز دوم). در بین مراحل اول و دوم، یک مرحله بینابینی خاموش نیز وجود دارد که از دقیقه ۶ تا دقیقه ۱۰ به طول می‌انجامد و رفتار درد کمی در طول آن مشاهده می‌شود (اینترفاز) (۲۲). طی این آزمون پاسخ‌های رفتاری به درد به صورت شدت درد، کمی می‌شوند، بدین ترتیب که در درجه صفر، حیوان بدون درد بوده و پا کاملاً روی کف واقع شده و وزن حیوان روی آن قرار می‌گیرد. در درجه ۱، حیوان نوک پا را روی زمین می‌گذارد؛ در درجه ۲، حیوان پا را تمام مدت بالا نگه می‌دارد و در درجه ۳، حیوان پا را تکان داده، گاز می‌گیرد و یا لیس می‌زند. بر این اساس در این مطالعه، شدت درد هر ۱۵ ثانیه ثبت گردید، سپس میانگین شدت درد در ۵ دقیقه اول به‌عنوان فاز اول، در دقیقه ۱۰-۶، اینترفاز و در دقیقه ۶۰-۱۱، فاز دوم در نظر گرفته شد و نمودارها بر همین اساس ترسیم شدند.



نمودار شماره ۱: مقایسه تعداد دفعات مالش چشم پس از اضافه کردن هیدروکسید آمونیوم در چشم موش‌های صحرایی بین گروه‌های C-normal و C-lesion (دریافت‌کننده کپسایسین نوزادی) و شم (دریافت‌کننده حلال کپسایسین نوزادی). نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند. ($n=7$) و ($p < 0.001$)* در مقایسه با گروه C-normal.

از طرفی، مقایسه نتایج در سه گروه حیوانات C-normal، C-lesion و شم (دریافت‌کننده حلال کپسایسین نوزادی و دریافت‌کننده سالین طی تجویز نخاعی) نشان داد احساس درد شیمیایی در دو گروه حیوانات با فیبرهای C طبیعی (گروه C-normal) ($1/5 \pm 0/1$) فاز ۱، $0/9 \pm 0/1$ اینترفاز و $1/9 \pm 0/1$ (فاز ۲) و شم ($1/4 \pm 0/9$) فاز ۱، $1/02 \pm 0/1$ اینترفاز و $1/8 \pm 0/9$ (فاز ۲)، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند، این درحالی بود که درد شیمیایی در گروه دریافت‌کننده کپسایسین نوزادی (C-lesion) ($0/8 \pm 0/7$) فاز ۱، $0/4 \pm 0/4$ اینترفاز و $1/3 \pm 0/8$ (فاز ۲) نسبت به دو گروه C-normal، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p < 0/01$)، (نمودار شماره ۲).

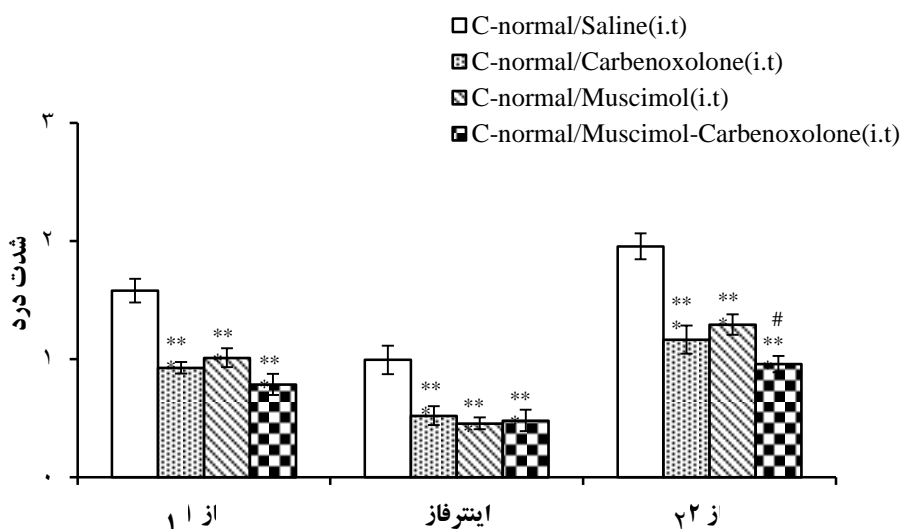
از طرفی، مقایسه نتایج در سه گروه حیوانات C-normal، C-lesion و شم (دریافت‌کننده حلال کپسایسین نوزادی و دریافت‌کننده سالین طی تجویز نخاعی) نشان داد احساس درد شیمیایی در دو گروه حیوانات با فیبرهای C طبیعی (گروه C-normal) ($1/5 \pm 0/1$) فاز ۱، $0/9 \pm 0/1$ اینترفاز و $1/9 \pm 0/1$ (فاز ۲) و شم ($1/4 \pm 0/9$) فاز ۱، $1/02 \pm 0/1$ اینترفاز و $1/8 \pm 0/9$ (فاز ۲)، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند، این درحالی بود که درد شیمیایی در گروه دریافت‌کننده کپسایسین نوزادی (C-lesion) ($0/8 \pm 0/7$) فاز ۱، $0/4 \pm 0/4$ اینترفاز و $1/3 \pm 0/8$ (فاز ۲) نسبت به دو گروه C-normal، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p < 0/01$)، (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه نتایج در سه گروه حیوانات C-normal، C-lesion و شم (دریافت کننده حلال کپسایسین نوزادی و دریافت کننده سالیین طی تجویز نخاعی). نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند. (n=7) و $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه (C-normal/Saline(i.t)).

معنی دار درد شیمیایی در هر دو فاز نوروزنیک و التهابی گردید (از ۱: 1.01 ± 0.08 فاز ۱، 0.4 ± 0.05 ایترفاز و 1.2 ± 0.08 فاز ۲) ($p < 0.001$). از طرفی، مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه دریافت کننده کربنوکسالون و گروه دریافت کننده توأم کربنوکسالون و موسیمول در حیوانات C-normal، نشان دهنده کاهش معنی دار درد شیمیایی فقط در فاز التهابی آزمون فرمالین بود (0.7 ± 0.09 فاز ۱، 0.4 ± 0.09 ایترفاز و 0.9 ± 0.07 فاز ۲) که نشان می‌داد موسیمول می‌تواند باعث تقویت تأثیر کربنوکسالون در کاهش درد شیمیایی شود ($p < 0.01$)، (نمودار شماره ۳).

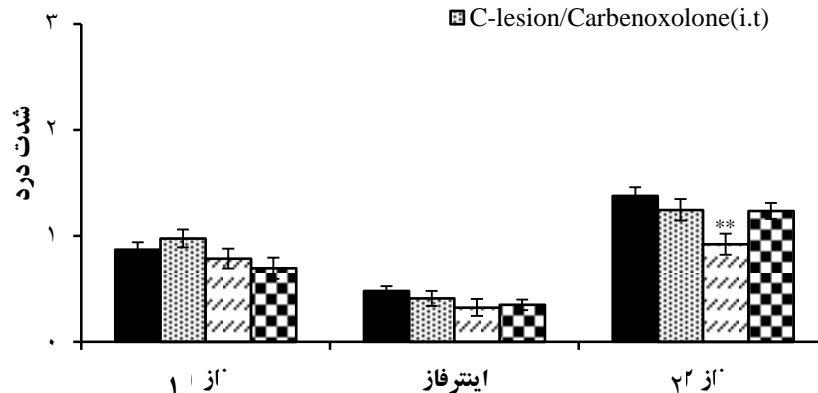
یافته‌های حاصل از آزمون فرمالین در گروه حیوانات C-normal که در دوران نوزادی هیچ محلولی را دریافت نکرده بودند نشان داد در گروه دریافت کننده کربنوکسالون به عنوان مسدودکننده اتصالات منفذدار در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین در حیوانات C-normal، تجویز نخاعی کربنوکسالون منجر به کاهش درد شیمیایی در هر دو فاز نوروزنیک و التهابی آزمون فرمالین شده است (0.9 ± 0.04 فاز ۱، 0.5 ± 0.08 ایترفاز و 1.1 ± 0.1 فاز ۲) ($p < 0.001$). همچنین تجویز نخاعی موسیمول به عنوان آگونیست گابا - A در مقایسه با سالیین نیز منجر به کاهش



نمودار شماره ۳: مقایسه نتایج در گروه‌های حیوانات C-normal دریافت کننده سالیین، کربنوکسالون و موسیمول به تنهایی و به صورت توأم طی تجویز نخاعی. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند. (n=7) و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه C-normal/Saline(i.t) و $p < 0.05$ # در مقایسه با گروه C-

نتایج حاصل از آزمون فرمالین نشان داد تجویز نخاعی کربنوکسالون در حیوانات C-lesion در مقایسه با تجویز سالین، تغییر معنی‌داری در احساس درد شیمیایی ایجاد نمی‌کند (۰/۹±۰/۰۸ فاز ۱، ۰/۴±۰/۰۷ اینترفاز و ۱/۲±۰/۰۱ فاز ۲). این درحالی است که درد شیمیایی در فاز دوم آزمون فرمالین (فاز التهابی) طی تجویز نخاعی موسیمول در حیوانات C-lesion در مقایسه با سالین، کاهش معنی‌داری داشت (۰/۷±۰/۰۹ فاز ۱، ۰/۳±۰/۰۵ اینترفاز و ۱/۲±۰/۰۷ فاز ۲) (نمودار شماره ۴).

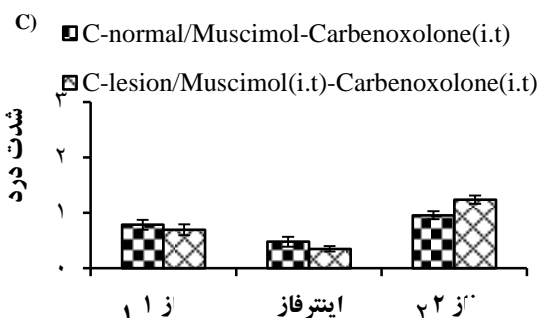
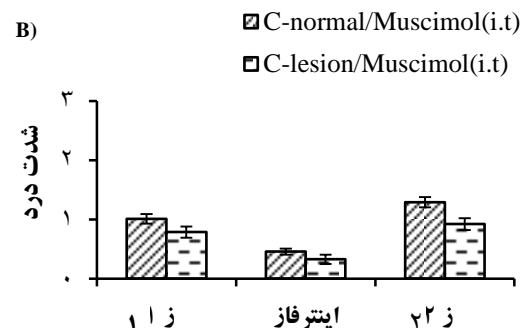
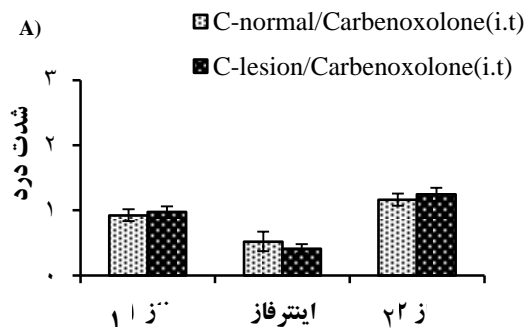
نتایج حاصل از آزمون فرمالین نشان داد تجویز نخاعی کربنوکسالون در حیوانات C-lesion در مقایسه با تجویز سالین، تغییر معنی‌داری در احساس درد شیمیایی ایجاد نمی‌کند (۰/۹±۰/۰۸ فاز ۱، ۰/۴±۰/۰۷ اینترفاز و ۱/۲±۰/۰۱ فاز ۲). این درحالی است که درد شیمیایی در فاز دوم آزمون فرمالین (فاز التهابی) طی تجویز نخاعی موسیمول در حیوانات C-lesion در مقایسه با سالین، کاهش معنی‌داری داشت (۰/۷±۰/۰۹ فاز ۱، ۰/۳±۰/۰۵ اینترفاز و ۱/۲±۰/۰۷ فاز ۲) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: مقایسه نتایج در گروه‌های حیوانات C-lesion دریافت‌کننده سالین، کربنوکسالون و موسیمول به تنهایی و به صورت توأم طی تجویز نخاعی. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند. (n=7) و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه (C-lesion/Saline(i.t)).

مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در بین گروه‌های C-normal و C-lesion {دریافت‌کننده کربنوکسالون (نمودار ۵A)، موسیمول (نمودار ۵B) و کربنوکسالون و موسیمول (نمودار ۵C)}، حاکی از عدم تغییر معنی‌دار در میزان درد شیمیایی بود.

مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در بین گروه‌های C-normal و C-lesion {دریافت‌کننده کربنوکسالون (نمودار ۵A)، موسیمول (نمودار ۵B) و کربنوکسالون و موسیمول (نمودار ۵C)}، حاکی از عدم تغییر معنی‌دار در میزان درد شیمیایی بود.



نمودار شماره ۵: مقایسه نتایج در گروه‌های حیوانات C-normal و C-lesion دریافت‌کننده سالین، کربنوکسالون و موسیمول به تنهایی و به صورت توأم طی تجویز نخاعی. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند. (n=7).

بحث

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد حذف فیبرهای نوع C به وسیله کپسایسین، منجر به کاهش احساس درد در هر دو فاز آزمون فرمالین نسبت به گروه C-normal می‌شود. با توجه به نقش فیبرهای نوع C در تئوری کنترل درجه‌ای درد (۱) و مدارهای نورونی شاخ پشتی نخاع که اولین محل بهمکنش سیناپسی در مسیر درد است (۲۳۸)؛ کاهش درد طی آزمون فرمالین با حذف فیبرهای نوع C توجیه پذیر است، به طوری که حذف فیبرهای نوع C باعث حذف اثر تحریکی مستقیم فیبرهای نوع C بر Projection نورون‌های مسیر درد می‌شود. از طرفی، با در نظر گرفتن وجود اینترنورون‌های گابا آرژیک در سطح شاخ پشتی نخاع، همچنین اثرات Anti-nociceptive آگونیست‌های گابا A- (۲۴)؛ در این مطالعه موسیمول به عنوان آگونیست گابا A- باعث کاهش احساس درد در هر دو فاز نوروزنیک و التهابی آزمون فرمالین شد. همچنین موسیمول در شرایط طبیعی با تقلید عملکرد گابا و تأثیر بر روی گابا A- در نورون‌های شاخ پشتی نخاع و نورون‌های آوران اولیه می‌تواند باعث مهار سلول در نتیجه کاهش انتقال ایمپالس درد در نخاع گردد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. گزارش‌های بسیاری گویای نقش اتصالات منفذدار در انتقال درد می‌باشند و مشاهده شده است کربنو کسالون به عنوان مسدودکننده اتصالات منفذدار باعث ایجاد بی‌دردی در آزمون‌های درد مختلف می‌شود که احتمالاً از طریق به هم ریختن آرایش کانکسین‌ها این اثرات را ایجاد می‌کند (۲۵). در پژوهش حاضر نیز کربنو کسالون احساس درد را در هر دو فاز آزمون فرمالین کاهش داد، لذا با توجه به اینکه در سیستم عصبی پستانداران حداقل ۶ نوع کانکسین در سلول‌های CNS (نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت‌ها) بیان می‌شوند (۱۴)، ممکن است در بین اینترنورون‌ها یا سلول‌های گلایال مرتبط با آنها (میکروگلیا و آستروسیت)، اتصالات منفذداری وجود داشته باشند که در انتقال سیگنال درد در سطح نخاع ایفای نقش می‌کنند، به طوری که انسداد آنها باعث کاهش انتقال درد می‌شود. در مطالعه حاضر، تجویز نخاعی موسیمول به همراه کربنو کسالون منجر به کاهش احساس درد طی فاز التهابی آزمون فرمالین شد، به طوری که کربنو کسالون، اثر موسیمول در کاهش درد را تقویت کرد.

با توجه به حضور اینترنورون‌های مهاری و تحریکی در شاخ پشتی نخاع و مدارهای نورونی توزیع شده در نورون‌های سطح شاخ پشتی نخاع (۲۳۸)، احتمالاً بین اینترنورون‌های مهاری اولیه، اتصالات منفذدار وجود دارد و آنها از طریق اینترنورون‌های مهاری ثانویه به Projection نورون‌ها مربوط می‌شوند. بدین ترتیب تحریک گابا A- بر سطح Projection نورون‌ها باعث کاهش انتقال ایمپالس درد شده و انسداد همزمان با تحریک گابا A- نیز منجر به تقویت این اثر کاهش می‌شود (۲۶). از طرفی، تجویز نخاعی کربنو کسالون در حیوانات C-lesion در مقایسه با تجویز نخاعی سالین به گروه تیمار شده با کپسایسین، تفاوت معنی‌داری را در میزان درد طی آزمون فرمالین نشان نداد. به عبارتی، مسدود کردن اتصالات منفذدار، تأثیری بیشتر از حذف فیبرهای نوع C بر روی کاهش احساس درد در آزمون فرمالین نداشت. با توجه به اینکه سطح شاخ پشتی نخاع (لامینای ۱ و ۲)، ترمینال‌هایی از تعداد فراوانی فیبرهای آوران میلیه و غیر میلیه دریافت می‌کند که حاوی اطلاعات مربوط به Nociception، درد، دما و سایر احساسات است (۷)، به فرض وجود اتصالات منفذدار بین ورودی‌های آوران درد، با حذف این فیبرها، اثر این اتصالات نیز از بین رفته و کاهش درد بیشتری مشاهده نمی‌شود. در مطالعه حاضر، تجویز نخاعی موسیمول در گروه C-lesion، منجر به کاهش احساس درد فقط در فاز التهابی آزمون فرمالین نسبت به تجویز نخاعی سالین در گروه دریافت‌کننده کپسایسین شد. در حالت حذف فیبرهای نوع C اگر فرض شود بین اینترنورون‌های مهاری اولیه و Projection نورون‌ها، اینترنورون‌های مهاری ثانویه وجود دارد (۲۶)، موسیمول باعث تقویت اثر مهار در این نورون‌ها؛ در نتیجه کاهش احساس درد در مقایسه با حالت عدم استفاده از موسیمول می‌شود. در این تحقیق، هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان درد شیمیایی بین گروه C-lesion (دریافت‌کننده توأم کربنو کسالون و موسیمول) و گروه C-lesion (دریافت‌کننده سالین)، وجود نداشت. به عبارت دیگر، حذف فیبرهای نوع C به تنهایی باعث کاهش درد همانند گروهی شد که علاوه بر حذف فیبرهای نوع C، کربنو کسالون و موسیمول را نیز به صورت نخاعی دریافت کرده بودند. در این حالت، احتمالاً با حذف فیبرهای نوع C و اتصالات منفذدار احتمالی بین آنها،

بنابراین، با وجود اینکه، اکثر نورون‌های سطح شاخ پشتی نخاع، اینترنورون‌های مدارهای محلی بوده و اینترنورون‌ها (مهاری یا تحریکی)، نقش بحرانی در سطح تحریک‌پذیری و خروجی نخاع بازی می‌کنند (۱۱)، همچنین علی‌رغم نقش مهم اتصالات منفذدار در انتقال درد (۲۶،۲۵)، مشاهده گردید اهمیت اینترنورون‌ها و اتصالات منفذدار در ارتباط با فیبرهای نوع C بوده است. این یافته‌ها گویای نقش بازر این فیبرها در نقل و انتقال علائم درد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در کل با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد در پی حذف فیبرهای نوع C و تحریک گیرنده‌های گابا A-، حذف Jzها به وسیله کربنوکسالون نمی‌تواند اثر قابل ملاحظه‌ای بر کاهش درد، بیش از آنچه که حذف فیبرهای نوع C و تحریک سیستم گاباژیک در سطح نخاع دارند، نشان دهد.

همچنین اتصالات منفذدار احتمالی بین اینترنورون‌های مهاری، شرایط مطابق زمانی می‌شود که تنها فیبرهای نوع C حذف شوند. با حذف اتصالات منفذدار بین اینترنورون‌های مهاری، اثر تقویت‌کنندگی موسیمول از طریق اتصالات بین اینترنورون‌های مهاری نیز کم‌رنگ می‌شود. همچنین در پژوهش حاضر، میزان درد شیمیایی طی آزمون فرمالین در پی تجویز نخاعی کربنوکسالون و موسیمول به‌تنهایی و تجویز توأم آنها در شرایط وجود فیبرهای نوع C با شرایط حذف این فیبرها، تفاوتی نشان نداد که این نتایج نیز مطابق با یافته‌های قبلی بر نقش مهم فیبرهای نوع C در انتقال درد تأکید دارد، به‌طوری‌که با حذف فیبرهای نوع C، اتصالات منفذدار احتمالی بین آنها نیز از بین می‌رود. موسیمول در شرایط حذف فیبرهای نوع C باعث کاهش بیشتر احساس درد نمی‌شود؛ زیرا احتمالاً گیرنده‌های گابا A- موجود بر روی این فیبرها نیز از بین می‌روند. هنگام استفاده از کربنوکسالون همراه موسیمول نیز این اثرات قابل مشاهده است.

References:

- Jarvis MF, Boyce-Rustay JM. Neuropathic pain: Models and mechanisms. *Curr Pharm Des* 2009;15(15):1711-16.
- Daehyun J, Chapman CR, Light AR. Glial mechanisms of neuropathic pain and emerging interventions. *Korean J Pain* 2009;22(1):1-15.
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(1):23-36.
- Gohar O. Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator* 2005;19:9-13.
- Harriott AM, Gold MS. Contribution of primary afferent channels to neuropathic pain. *Curr Pain Headache Rep* 2009;13(3):197-207.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-84.
- Lu Y, Perl ER. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J Physiol* 2007;582(Pt 1):127-36.
- Graham BA, Brichta AM, Callister RJ. Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol* 2007;98(3):1057-63.
- Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol* 1999;518(Pt 3):803-13.
- Loomis CW, Khandwala H, Osmond G, Hefferan MP. Coadministration of intrathecal strychnine and bicuculline effects synergistic allodynia in the rat: An isobolographic analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296(3):756-61.
- Enna SJ, McCarson KE. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol* 2006;54:1-27.

12. Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127(11):2516-24.
13. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(3):191-200.
14. Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, et al. Spinal gap junctions: Potential involvement in pain facilitation. *J Pain* 2004;5(7):392-405.
15. Bruzzone R, Dermietzel R. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res* 2006;326(2):239-48.
16. Alizadeh Z, Fereidoni M, Behnam-Rassouli M, Hosseini S. Role of C-fibers in pain and morphine induced analgesia/hyperalgesia in rats. *Iran J Neurol* 2014;13(1):1-8.
17. Afshar Kargar S, Fereidoni M, Mahdavi Shahri N. The effect of intrathecal administration of gap junction blocker and GABAA agonist and/or antagonist on chemical pain behavioral responses in male rat. *Med Daneshvar* 2013;20(105):31-40. [Full Text in Persian]
18. Hosseini M, Karami Z, Janzadenh A, Jameie SB, Haji Mashadi Z, Yousefifard M, et al. The Effect of intrathecal administration of muscimol on modulation of neuropathic pain symptoms resulting from spinal cord injury; an experimental study. *Emergency* 2014;2(4):1-7.
19. Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;554:221-33.
20. Farazifard R, Kiani R, Esteky H. Effects of GABAA receptor inhibition on response properties of barrel cortical neurons in C-fiber-depleted rats. *Brain Res* 2005;1050(1-2):27-32.
21. Yaksh TL, Rudy TA. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain* 1978;4(4):299-359.
22. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.
23. Lu Y, Perl ER. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 2003;23(25):8752-8.
24. Sawynok J. GABAergic mechanisms of analgesia: An update. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;26(2):463-74.
25. Kamalpour M, Fereidoni M, Moghimi A. Effects of intrathecal carbenoxolone treatment on nociception and analgesia in rat. *Balkan Med J* 2014;31(2):164-72.
26. Afshar-Kargar S, Fereidoni M, Mahdavi-Shahri N. The effect of intrathecal administration of gap junction blocker and GABA_A agonist and/or antagonist on chemical pain behavioral responses in male rat. *Med Daneshvar* 2013;20(105):31-40. [Full Text in Persian]

The Effect of Intrathecal Administration of Carbenoxolone and Muscimol on Chemical Pain in Rats Underwent C-fiber Removal Process

Masoud Fereidoni^{1*}; Simin Afshar-Kargar²

¹Associate Professor of Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

²Master of Sciences in Animal Physiology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding Author:
Masoud Fereidoni, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Email:
fereidoni@um.ac.ir

Received: 11 Aug, 2014

Accepted: 9 Nov, 2014

Abstract

Background and Objectives: Spinal cord dorsal horn lamina 2 receives many synaptic terminals from C fibers and a few from A β fibers. GABAergic inhibitory interneurons in lamina 2 play an important role in the pain sensation. Gap junctions (Gj) are intercellular channels, which provides cell to cell transport of small molecules and ions. In this research, the importance of C-fibers in pain transmission through GABAergic system and Gj manipulations, was investigated by formalin test using capsaicin, muscimol, and carbenoxolone.

Methods: In this experimental study, 9 groups of male wistar rats (200-250 g), including group treated with capsaicin in infancy, control group, and sham group, were used. Adult animals received saline, carbenoxolone (1nM) and muscimol (0.3 μ g) individually or as a form of co-treatment. After sub plantar injection of 0.05 ml of 2.5% formalin, pain related behavior was recorded for 1 hour. Data were compared using one-way ANOVA and post t-Tukey test. Significance level was considered to be $p < 0.05$.

Results: Analgesic effect was the same in groups treated in infancy with capsaicin, and received saline and carbenoxolone, but muscimol increased pain reduction in the inflammatory phase of formalin test ($p < 0.01$). Also, Co-treatment of carbenoxolone and muscimol did not show more pain reduction.

Conclusion: Considering the elimination of C-fibers and stimulation of GABA-A, elimination of Gj cannot show a significant effect on pain relief beyond what the elimination of C-fibers and stimulation of the GABAergic system at the spinal level can do.

Keywords: Pain; Nerve Fibers, Unmyelinated; Carbenoxolone; Muscimol.